



⑬ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Off nlegungsschrift**
⑩ **DE 198 26 972 A 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
A 61 K 38/05

⑦ Aktenzeichen: 198 26 972.2
② Anmeldetag: 18. 6. 98
③ Offenlegungstag: 23. 12. 99

DE 198 26 972 A 1

⑦ **Anmelder:**

Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, 39106 Magdeburg, DE; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06108 Halle, DE; Ansorge, Siegfried, Prof. Dr., 39291 Hohenwarthe, DE; Gollnick, Harald, Prof. Dr., 39130 Magdeburg, DE; Neubert, Klaus, Prof. Dr., 06128 Halle, DE

⑦ **Erfinder:**

Ansorge, Siegfried, Prof. Dr., 39291 Hohenwarthe, DE; Born, Ilona, Dr.rer.nat., 06128 Halle, DE; Bühling, Frank, Dr.med., 39108 Magdeburg, DE; Faust, Jürgen, Dr.rer.nat., 06132 Halle, DE; Gollnick, Harald, Prof. Dr., 39130 Magdeburg, DE; Lendeckel, Uwe, Dr.rer.nat., 39108 Magdeburg, DE; Neubert, Klaus, Prof. Dr., 06128 Halle, DE; Reinhold, Dirk, Dr.med., 39108 Magdeburg, DE; Vetter, Robert, Dr.med., 39112 Magdeburg, DE

⑤ **Entgegenhaltungen:**

WO 95 34 538 A2
WO 95 15 309 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

④ **Verwendung von Enzyminhibitoren und pharmazeutische Zubereitung zur Therapie von dermatologischen Erkrankungen mit follikulären und epidermalen Hyperkeratosen und einer verstärkten Keratinozytenproliferation**

⑤ Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren, bei dem durch die Hemmung der Enzymaktivität der auf humanen Keratinozyten exprimierten Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, EC3.4.14.5, CD 26) durch entsprechende spezifische Inhibitoren die Aktivierung und DNS-Synthese und damit die Proliferation (Zellvermehrung) dieser Zellen supprimiert wird. Die Verwendung und pharmazeutischen Zubereitungen können zur unterstützenden Therapie von sowohl entzündlichen und nicht entzündlichen epidermalen Hyperproliferationszuständen (z. B. congenitale Ichthyosen und Psoriasis), benignen und malignen umschriebenen epidermalen clonalen Expansionen (z. B. Warzen, Condylome, aktinische Keratosen/Präcancerosen), benignen und malignen Hyperproliferationszuständen (z. B. Akne) als auch benignen und malignen epithelialen Adnextumoren und primären und reaktiven Nagelzell-hyperproliferationen angewandt werden und sind für die pharmazeutische Industrie von Bedeutung.

DE 198 26 972 A 1

Die Erfindung beschreibt die Hemmung der Enzymaktivität der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, E. C. 3.4.14.5, CD26) bzw. DP IV analoger Enzyme humaner Keratinozyten durch spezifische Inhibitoren auf der Basis von Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidderivaten über die die Aktivierung und DNS-Synthese und damit die Proliferation (Zellvermehrung) dieser Zellen supprimiert wird.

Eine Reihe dermatologischer Erkrankungen gehen mit follikulären und epidermalen Hyperkeratosen und einer verstärkten Keratinozytenproliferation einher. Zu ihnen gehören sowohl entzündliche und nicht entzündliche epidermale Hyperproliferationszustände (z. B. congenitale Ichthyosen und Psoriasis), benigne und maligne umschriebene epidermale clonale Expansionen (z. B. Warzen, Condylome, aktinische Keratosen/Präcancerosen), benigne und maligne follikuläre Hyperproliferationszustände (z. B. Akne) als auch benigne und maligne epitheliale Adnextumoren und primäre und reaktive Nagelzellhyperproliferationen. Detailinformationen dazu sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 enthalten.

Peptidasen wie die Dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD26, E. C. 3.4.14.5) sind für die Regulation bzw. Modulation von Wechselwirkungen zwischen Zellen besonders interessant, da sie als Ektoenzyme in der Plasmamembran der Zellen lokalisiert sind, Interaktionen mit anderen extrazellulären Strukturen eingehen, periderge Botenstoffe durch enzymkatalysierte Hydrolyse aktivieren bzw. inaktivieren und dadurch wichtig für die Zell-Zell-Kommunikation sind [Yaron A, et al.: Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. Crit Rev Biochem Mol Biol 1993; 28: 31-81; Vanhoof G, et al.: Proline motifs in peptides and their biological processing. FASEB J 1995; 9: 736-744].

Es ist gezeigt worden, daß die DP IV im Prozeß der Aktivierung und klonalen Expansion von Immunzellen, insbesondere von T-Lymphozyten eine Schlüsselfunktion spielt [Fleischer B: CD26: a surface protease involved in T-cell activation. Immunol Today 1994; 15: 180-184]. Der Enzymaktivität der DP IV kommt dabei eine besondere Rolle zu [Ansorge S, et al.: Membranebound peptidases of lymphocytes: Functional implications. Biomed Biochem Acta 1991; 50: 799-807; Tanaka T, et al. The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 4586-4590]. Verschiedene Funktionen mitogenstimulierter mono-nukleärer Zellen und gereinigter T-Lymphozyten wie DNS-Synthese, Produktion von immunstimulierenden Zytokinen (IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ) und Helferfunktionen für B-Zellen (IgG- und IgM-Synthese) können in Gegenwart von spezifischen Inhibitoren der DP IV gehemmt werden [Schön E, et al.: The dipeptidyl peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes. Biomed. Biochim. Acta 1985; 2, K9-K15; Schön E, et al. The role of dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocyte activation. Inhibitors and antibodies against dipeptidyl peptidase IV suppress lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis in vitro. Eur J Immunol 1987; 17: 1821-1826; Reinhold D, et al. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor- β_1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. Immunology 1997; 91: 354-360].

Es ist bereits bekannt, daß die Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßung durch Hemmung der auf Immunzellen lokalisierten Dipeptidylpeptidase IV mit Hilfe von synthetischen Inhibitoren möglich ist (z. B. EP764151 A1, WO09529691, EP731789 A1, EP528858).

Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, daß eine Hemmung der DP IV-Enzymaktivität von Keratinozyten zu einer Suppression der DNS-Synthese und damit der Proliferation dieser Zellen führt.

Unsere Erfindung zeigt, daß zur Therapie von sowohl entzündlichen und nicht entzündlichen epidermalen Hyperproliferationszuständen (z. B. congenitale Ichthyosen und Psoriasis), benignen und malignen umschriebenen epidermalen clonalen Expansionen (z. B. Warzen, Condylome, aktinische Keratosen/Präcancerosen), benignen und malignen follikulären Hyperproliferationszuständen (z. B. Akne) als auch benignen und malignen epithelialen Adnextumoren und primären und reaktiven Nagelzellhyperproliferationen Effektoren der Dipeptidylpeptidase IV-Enzymaktivität geeignet sind.

Die oben genannten Erkrankungen werden bisher topisch mit antiproliferativen und differenzierenden Substanzen (Salizylsäure, Harnstoff, endogene und synthetische Retinoide, Vitamin D3-Derivate, Kortikosteroide) sowie systemisch mit z. T. immunsuppressiven und antiproliferativen Präparaten (z. B. Cyclosporin A, Kortikosteroide, Retinoide) behandelt. Meist kommen nicht Monotherapien sondern Arzneimittelkombinationen zum Einsatz. Insbesondere bei der systemischen Anwendung treten häufig unerwünschte Nebenwirkungen auf. DP IV-Inhibitoren würden bei den genannten Erkrankungen eine neuartige, kostengünstige Therapieform und einen wertvollen alternativen Bestandteil der bestehenden integrierten Therapiekonzepte darstellen.

Im einzelnen liegen der Erfindung die Befunde zugrunde, daß

1. die DP IV-Enzymaktivität, wie sie auf humanen adulten und neonatalen Keratinozyten exprimiert wird, durch Inhibitoren der DP IV gehemmt werden kann.
2. diese Inhibitoren die DNS-Synthese von humanen Keratinozyten inhibieren.

Die Applikation von Enzyminhibitoren stellt somit bei den genannten Erkrankungen eine neuartige Methode und ergänzende Therapieform zur Behandlung von hyperkeratotischen Prozessen dar.

Die erfindungsgemäß applizierten Effektoren der DP IV können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, inhibitorisch wirkende Peptide und Peptidderivate, Antikörper dieses Enzymes zur Anwendung kommen. Bevorzugte Effektoren sind z. B. synthetische DP IV-Inhibitoren wie Aminosäurethiazolidide, -pyrrolidide, -piperidide. Derartige Verbindungen und deren Herstellung wurden in einem früheren Patent beschrieben (K. Neubert et al., DD 296075 AS).

Die verwendeten Inhibitoren werden mit bekannten Trägerstoffen verabreicht. Die Verabreichung erfolgt einerseits als topische Applikation in Form von z. B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln einschließlich instillativer Applikation, andererseits als systemische Applikation zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären Anwendung in geeigneten Rezepturen bzw. in geeigneter Galenik.

Beispiel 1

Inhibierung der Proliferation von humanen Keratinozyten durch Inkubation mit synthetischen DP IV-Inhibitoren

Unsere Untersuchungen zeigten, daß humane Keratinozyten (sowohl adulte als auch neonatale) die DP IV/CD26 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Tabelle 1). Dieser Nachweis erfolgte mittels Durchflußzytofluorimetrie und DP IV-Enzymassay in vitro an drei unterschiedlichen adulten Keratinozytenkulturen (NHEK Ad, RUM, ROL) und einer neonatalen Kultur (NHEK Neo).

Tabelle 1

DP IV-Expression und Enzymaktivität humaner Keratinozytenkulturen

	CD26-positive Zellen [%]	DP IV-Aktivität [pkat/10 ⁶ Zellen]
NHEK Ad	36 ± 6	61 ± 13
NHEK Neo	25 ± 4	39 ± 10
RUM	34 ± 3	39 ± 5
ROL	33 ± 3	84 ± 7

Diese Keratinozytenkulturen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der synthetischen reversiblen DP IV-Inhibitoren Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid und Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid inkubiert und nach 72 Stunden die DNS-Synthese (³H-Thymidincinbau) gemessen.

Die Diagramme in Abb. 1 zeigen den Einfluß der synthetischen reversiblen DP IV-Inhibitoren Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid und Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid auf die DNS-Synthese humaner Keratinozyten. Wie aus diesen Diagrammen ersichtlich ist, hemmen die DP IV-Inhibitoren dosisabhängig die DNS-Synthese und damit die Zellproliferation aller vier untersuchten Keratinozytenkulturen. Die Vitalität der Zellen war nicht beeinflusst (nicht dokumentiert).

Beispiel 2

Inhibierung der Proliferation der humanen Keratinozytenzelllinie HaCat durch Inkubation mit synthetischen DP IV-Inhibitoren.

Die humane Keratinozytenzelllinie HaCat, welche als Zellmodell für die Psoriasis akzeptiert ist, exprimiert ebenfalls die DP IV auf ihrer Oberfläche (21 ± 4% CD26-positive Zellen, 30,2 ± 5 pkat/10⁶ Zellen). Das Diagramm in Abb. 2 zeigt den Einfluß der synthetischen reversiblen DP IV-Inhibitoren Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid und Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid auf die DNS-Synthese der humanen HaCat-Zelllinie. Entsprechend Abb. 2 hemmt eine Inkubation dieser Zellen mit den synthetischen DP IV-Inhibitoren Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid, Lys[Z(NO₂)]-pyrrolidid oder Lys[Z(NO₂)]-piperidid die DNS-Synthese und damit die Zellproliferation dosisabhängig. Die Zellvitalität ist durch die Inhibitoren unbeeinflusst (nicht dokumentiert).

Tabelle 2

epidermale Hyperproliferationszustände

5	z. B. nicht entzündlich	z. B. entzündlich
	- congenitale Ichthyosen	- Psoriasis und Subtypen einschließlich Nägel und Haare
	- acquirierte Ichthyosen (paraneoplast.)	- Lichen ruber und Subtypen
10	- Palmoplantarkeratosen	- Parapsoriasis-Gruppe
	- congenital	- Keratosis lichenoides
	- erworben/paraneoplast.	- Lichen simplex chronicus + reaktive lichenoides
	- M. Darier	Hyperproliferationen (z. B. atopische Dermatitis)
	- Epidermale Naevi	- Lichenoid Reaktionen bei GvHD
	- Cutis rhomboidalis nuchae	- ILVIEN-Naevus
15	- Acanthosis nigricans	- Lupus erythematoses chron. disc./SCLE/SLE
	- Pachydermie	- Pityriasis rubra pilaris
		-
20		M. Grover
		- Vitiligo
		- mit Hyperproliferation von Keratinozyten einhergehende Erythrodermien

umschriebene epidermale clonale Expansion

25	benigne	maligne
	- HPV-assoziiert (Warzen/Condylome)	- HPV-assoziierte Tumoren
	-	- aktinische Keratosen/Präcancerosen
	seborrhische Keratosen	
	- Hidroakanthome/Porome	- M. Bowen + Bowen-CA
30	- Epidermalcysten	- M. Paget + Paget-CA
	- Milien	- Plattenepithel-CA
	- M. Gottron	- Merkelcell-CA

follikuläre Hyperproliferationszustände

35	benigne	maligne
	- Akne	- Haarfollikelzelltumoren
	- akneiforme follikuläre Reaktionen	- Proliferierende Trichilemmalcysten
40	- Ulerythema ophryogenes	- Mischtumoren
	- Keratosis follicularis	
	- Steatocystoma multiplex	
	- Hypertrichosen	
	- Talgdrüsen-Naevi	
45	Trichilemmalcysten	

Tabelle 3

epitheliale Adnextumoren

50	benigne	maligne
	- Porom	- ekkrine/apokrine CA's und Subtypen
	- syringoductale Tumoren	- Talgdrüsen-CA
55	- Hidradenome	
	- Spiradenome	
	- Cylindrome	

primäre und reaktive Nagelzellhyperproliferation

60		nicht infektiös
	- congenital	erworben
65	z. B. Pachyonychien	infektiös bei Mykosen

Patentansprüche

1. Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV)-Enzymaktivität bzw. DP IV-analoger-Enzymaktivität zur Hemmung der Aktivierung und Proliferation von Keratinozyten und von maligne transformierten Keratinozyten, also von von Keratinozyten abstammenden Tumorzellen.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV)-Enzymaktivität bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Therapie von sowohl entzündlichen und nicht entzündlichen epidermalen Hyperproliferationszuständen (z. B. congenitale Ichthyosen und Psoriasis), benignen und malignen unbeschriebenen epidermalen clonalen Expansionen (z. B. Warzen, Condylome, aktinische Keratosen/Präcancerosen), benignen und malignen Hyperproliferationszuständen (z. B. Akne) als auch benignen und malignen epithelialen Adnextumoren und primären und reaktiven Nagelzellhyperproliferationen dienen.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV)-Enzymaktivität bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität Aminosäurederivate, Peptide oder Peptidderivate bzw. Kombinationen der genannten Effektoren verwendet werden.
4. Verwendung gemäß Anspruch 1, 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindungen synthetische DP IV-Inhibitoren, bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide, entsprechende Peptidderivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Aminosäureamidderivate und deren Salze sind, wobei Xaa eine α -Aminosäure bzw. ein α -Aminosäurederivat bevorzugt L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin, N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin ist und als Amidstruktur cyclische Amine z. B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren.
5. Verwendung gemäß Anspruch 1, 2, 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß Aminosäureamide z. B. N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperidid-Derivat bevorzugt als DP IV-Inhibitoren eingesetzt werden.
6. Pharmazeutische Zubereitungen zur Behandlung von Zuständen oder Störungen unter Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV)-Enzymaktivität bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität, die eine Hemmung der Aktivierung und Proliferation von Keratinozyten und von maligne transformierten Keratinozyten bewirken.
7. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Anspruch 6 zur Behandlung von dermatologischen Autoimmunerkrankungen mit hyperkeratotischen Effloreszenzen (cutaner und systemischer Lupus erythematoses), von Psoriasis, von dermatologischen Erkrankungen (Plattenepithelkarzinom, Basaliom, Aktinische Präkanzerosen, Keratokanthom, u. a.) und von Hyperkeratotischen Erbkrankheiten (Ichthyosen).
8. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die DP IV-Inhibitoren bevorzugt Substanzen gemäß Anspruch 4 und 5 sind.
9. Verwendung von Inhibitoren oder pharmazeutische Zubereitung gemäß Ansprüche 1 bis 8 als topische Applikation in Form von z. B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln, einschließlich instilativer Applikation.
10. Verwendung von Inhibitoren oder pharmazeutische Zubereitung gemäß Anspruch 1 bis 8 als systemische Anwendung zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären Applikation in entsprechenden Rezepturen bzw. in geeigneter Galenik mit üblichen Trägerstoffen, Hilfsmitteln und/oder Zusatzstoffen.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

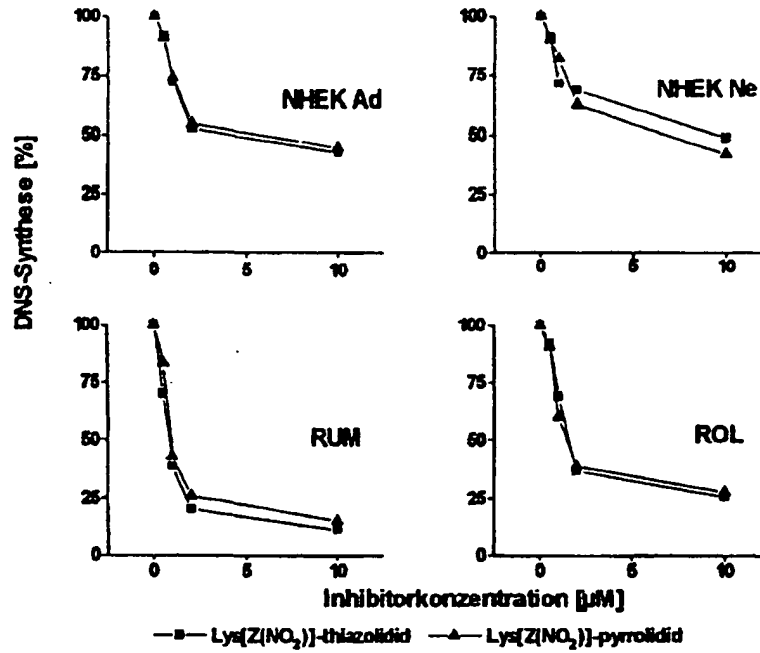


Abb. 1

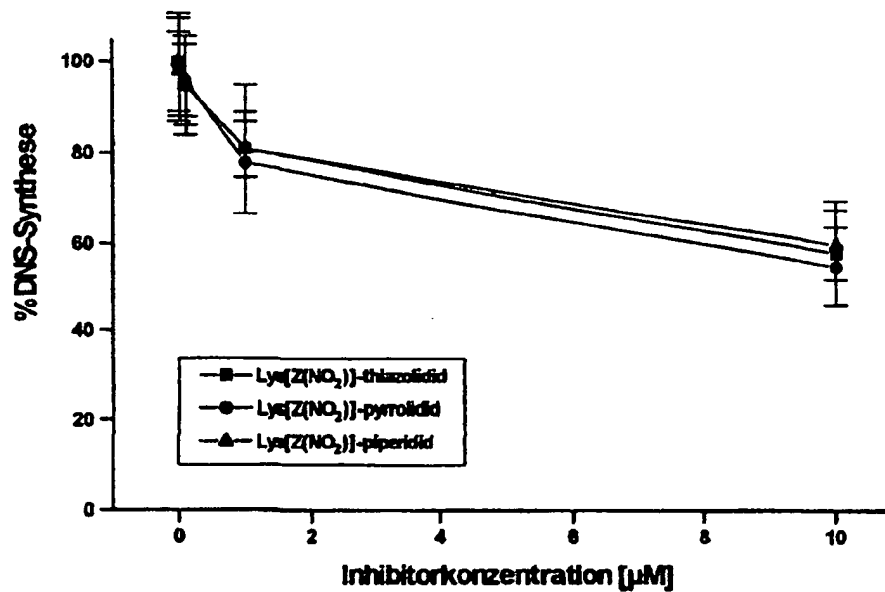


Abb. 2